

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFFECTO DE LA VITRIFICACIÓN EMBRIONARIA SOBRE EL PROTEOMA DE HÍGADOS DE CONEJO

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Silvia Redondo García

TUTOR: D. Francisco Marco Jiménez

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, Julio de 2014



Datos personales

Nombre y apellidos: Silvia Redondo García

Datos del trabajo final de grado

Título del TFG: Efecto de la vitrificación embrionaria sobre el proteoma de hígados de conejo

Lugar de realización: Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica Valencia

Localidad: Valencia

Fecha de lectura: Julio 2014

Tipo de Licencia: Creative Commons: "Reconocimiento No Comercial – Sin Obra Derivada"

Tutor: D. Francisco Marco Jiménez

Abstract

Preimplantation mammalian embryos are sensitive to environmental conditions. However, they are able to adapt to environmental changes through mechanisms which include modification of gene expression (reprogramming). Oocytes and embryos cryopreservation is considered an important tool in assisted human reproduction, but its neutrality has been questioned recently. Moreover, little is known about long-term effects on adult individuals and their offspring.

Then, the aim of this study was to evaluate whether early embryos vitrification induces long-term protein disorders in adult livers. For this purpose, 10 samples from adult rabbit livers (8 months), which came from 3-days embryos (5 of them were vitrified) were taken, transferred to recipient females and checked until adulthood. A proteomic study was performed using two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Subsequently, functional annotation was carried out by comparing the sequences to NCBI databases.

Of the nine spots found, four were overexpressed in embryo vitrified samples and four underexpressed. One of the spots was represented by a single protein named catalase (CAT). This protein reduces the levels of hydrogen peroxide in liver in order to decrease oxidative stress effects. Remaining spots contained a protein mixture.

Therefore, it was concluded that vitrification may have long-term effects on adult individuals and it should not be considered as a neutral practice.

Key Words

Embryo cryopreservation, embryo reprogramming, long-term effects, gene expression, adult liver, proteomic analysis.

Resumen

Los embriones preimplantacionales de mamíferos son sensibles a las condiciones ambientales de su entorno, sin embargo son capaces de adaptarse a las alteraciones del ambiente mediante mecanismos que incluyen la modificación de su expresión génica (reprogramación). La crioconservación de óvulos y embriones es considerada una herramienta importante en la reproducción humana asistida, pero su neutralidad ha sido recientemente cuestionada y poco se sabe hasta la fecha acerca de los efectos que tiene a largo plazo sobre los individuos adultos y la descendencia.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la vitrificación de embriones tempranos induce alteraciones proteicas a largo plazo en el hígado de individuos adultos. Para ello se utilizaron 10 muestras de hígados de conejos adulto (8 meses) procedentes de embriones de 3 días (5 de ellos vitrificados), transferidos a hembras receptoras y seguidos hasta su edad adulta. Se realizó un estudio proteómico mediante electroforesis bidimensional y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Posteriormente se realizó la anotación funcional comparando las secuencias con las bases de datos de la NCBI.

De los nueve spots encontrados, cuatro de ellos estaban sobreexpresados en las muestras de embriones vitrificados y cuatro subexpresados. Uno de los spots estaba representado por una proteína única, la catalasa (CAT), la cual reduce los niveles de peróxido de hidrógeno en el hígado para disminuir los efectos debidos al estrés oxidativo. El resto de spots contenían mezcla de proteínas.

Por tanto, se concluyó que la vitrificación puede tener efectos a largo plazo sobre los individuos adultos y no debería ser considerada como una técnica neutral.

Palabras clave

Crioconservación embrionaria, reprogramación embrionaria, efectos a largo plazo, expresión génica, hígado adulto, análisis proteómico.

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de dar las gracias a las personas que han formado parte de esta aventura durante los últimos cuatro años, porque tanto ellos se van a llevar un trocito de mí, como yo de ellos.

En primer lugar tengo que agradecer a Paco, mi tutor, los conocimientos y las ganas que me ha transmitido. Desde el primer día estuvo seguro de que podíamos sacar esto hacia adelante, y ha sabido sacar lo mejor de mí para hacer este proyecto posible.

También se merece una mención especial Mara. Has estado conmigo en cada paso desde el primer día, y estoy segura de que sin tu ayuda esto no habría sido lo mismo. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y has aguantado, y por haber estado ahí siempre que me has hecho falta.

Por supuesto no me puedo olvidar del resto de gente del laboratorio que ha hecho que tanto mis compañeros de clase como yo nos hayamos sentido como en casa. Muchas gracias a Jose, Estrella, Carmen, Amparo y Luis, seguid siendo como sois.

Estos cuatro años han dado para mucho. Me llevo a grandes amigos, pero tres de ellos han sido, son y serán pilares básicos para mí. Tengo que agradecer a Ximo las mil y una conversaciones que hemos tenido, y en las que nos hemos dado cuenta de que aunque no nos acordemos muy bien cómo fue (porque no nos acordamos ninguno) conocernos nos ha ayudado a ambos y los dos sabemos que esto durará para siempre. Gracias también a Gracián por ser como es y por estar siempre dispuesto a organizar cualquier plan para que Ximo y yo sigamos teniendo vida social, aunque se indigne porque según él “estemos desperdiciando nuestra juventud”. Ambos sois responsables de muchos de los buenos momentos que me llevo de la carrera. Y por último, y no por ello menos importante, me gustaría agradecer a mi compañera de batallas, fatigas, risas y llantos todo lo que ha hecho por mí este tiempo. Gracias Sario por hacerme entrar en razón en muchas ocasiones, y por llevarme por el camino de la amargura en muchas otras. Esto no va a acabar aquí, da igual donde acabemos porque estaremos juntas siempre. Muchas gracias a los tres, sois lo mejor que me llevo sin duda.

Tampoco podré olvidar al resto de amigos que me han aguantado este tiempo, han reído mis gracias y tonterías y me han dicho las cosas claras cuando era necesario. Muchas gracias por todo a Laura R, Miriam, Olga, Jose, Pablo, Carol y David. No cambiéis nunca.

Este último año ha sido muy duro, pero dos personas han sido capaces de hacerme desconectar y ver todo desde otra perspectiva, aunque seguro que en más de una ocasión se les ha

pasado por la cabeza echarme del piso. Muchas gracias a Noelia y Laura G. por hacerme la convivencia tan fácil.

Fuera de Valencia, también tengo gente a la que agradecer muchas cosas. A mis amigas de toda la vida por los grandes momentos vividos y por los que nos quedan por vivir. Muchas gracias a mi asociación de bacinerías: Janira, Alba, María P.I., Ainoa, Lucía, Ana, Susana, Lorena y María P.P. Sois las mejores sin duda.

Para terminar me gustaría agradecer a toda mi familia el apoyo y la confianza que han depositado sobre mí durante todo este tiempo y en etapas anteriores. Gracias por estar siempre a mi lado y por hacerme todo más fácil. Gracias a mis padres y a mis hermanos, no me podría haber tocado una familia mejor.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL CONEJO (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) COMO MODELO ANIMAL	1
1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL	1
1.3. EFECTOS SOBRE LA REPROGRAMACIÓN EMBRIONARIA.....	3
1.3.1. EFECTOS SOBRE EL HÍGADO	5
1.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR DE PROTEÍNAS	6
1.4.1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL CONVENCIONAL EN GEL.....	6
1.5. LA CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONARIA	8
1.5.1. MÉTODOS DE CRIOCONSERVACIÓN.....	8
1.5.2. ALTERACIONES CAUSADAS POR LA CRIOCONSERVACIÓN	10
 2. OBJETIVO	 11
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	 12
3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	12
3.2. EXTRACCIÓN PROTEICA Y CUANTIFICACIÓN	13
3.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA	14
3.3.1. HIDRATACIÓN DE LAS TIRAS DE ELECTROFORESIS.....	14
3.3.2. SEPARACIÓN POR ISOELECTROENFOQUE Y EQUILIBRADO DE LAS TIRAS.....	15
3.3.3. SEGUNDA DIMENSIÓN	15
3.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	16
3.4.1. TINCIÓN	16
3.4.2. DETECCIÓN	16
3.4.3. IDENTIFICACIÓN	17
3.5. ANOTACIÓN FUNCIONAL.....	18
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
 4. RESULTADOS	 19
4.1. EVALUACIÓN BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS MEDIANTE 2-DE	19
4.2. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	23

5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIÓN	28
7. REFERENCIAS.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo embrionario temprano. A: estado pronuclear. B: embrión de 2 células. C: embrión de 4 células. D: embrión de 8 células. E: mórula. F: blastocisto expandido (Sultana <i>et al.</i> , 2009).	2
Figura 2. Desarrollo embrionario desde el estadio de blastocisto hasta el comienzo de la gastrulación (adaptada de Fischer <i>et al.</i> , 2012).....	2
Figura 3. Estructuras feto-placentarias en día 14 de gestación (Sáenz-De-Juano, 2014)	3
Figura 4. Esquema de los pasos de la electroforesis bidimensional convencional en gel de poliacrilamida (2-DE) (adaptada de Laborde <i>et al.</i> , 2011)	7
Figura 5. Estado cristalino generado por congelación (A) y estado vítreo amorfo estable generado por vitrificación (B)	9
Figura 6. Línea blanca de conejo neozelandés del ICTA	12
Figura 7. Hígado extraído de los conejos a partir del cual se realizó el análisis proteómico.....	12
Figura 8. Diseño experimental.	14
Figura 9. Protean i12 IEF cell de Bio-Rad utilizado para realizar las electroforesis bidimensionales	14
Figura 10. Superposición de geles con todas las proteínas encontradas en hígado	19
Figura 11. Localización de los spots diferencialmente expresados en el gel bidimensional y valor de <i>fold change</i>	20
Figura 12. Áreas marcadas en los geles de los spots subexpresados (154, 346, 402 y 642) y sobreexpresados (217, 222, 234 y 268).	21
Figura 13. Gráfico que muestra las principales funciones moleculares en las que están involucradas las proteínas detectadas como diferencialmente expresadas, indicando el número de proteínas que interviene en cada función entre paréntesis	23
Figura 14. Gráfico que muestra los principales procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas detectadas como diferencialmente expresadas, indicando el número de proteínas que interviene en cada proceso entre paréntesis.....	24
Figura 15. Estructura secundaria de la catalasa (Protein Data Bank, visto el 7 de junio de 2014).....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los patrones de BSA para realizar la curva patrón.....	13
Tabla 2. Composición de las soluciones de equilibrio 1 y 2	15
Tabla 3. Composición <i>Running Buffer</i>	16
Tabla 4. Información descriptiva de las 23 proteínas de los spots diferencialmente expresados con mezclas tras su análisis mediante espectrometría de masas.....	22

ABREVIATURAS

2-DE Electroforesis bidimensional convencional en gel

ACN Acetonitrilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

ANOVA Análisis de varianza

ARN Ácido ribonucleico

BCA Ácido bicinconínico

BLASTO2GO Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales de proteínas en la Gene Ontology

BLAST2SEQ Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales entre 2 secuencias de proteínas

BLASTP Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales de proteínas

BSA Albúmina sérica bovina

DPBS Tampón fosfato salino de Dulbecco

DTT Ditioneitol

FA Ácido fórmico

GO Gene Ontology

HPA eje hipotálamo-pituitaria-adenocortical

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

ICTA Instituto de Ciencia y Tecnología Animal

ICM Masa celular interna

IEF Isoelectroenfoque

LC Cromatografía líquida

MS Espectrometría de masas

MS/MS Espectrometría de masas en tándem

NAFLD Enfermedad del hígado graso no alcohólico

NCBI Centro nacional de información biotecnológica

NCBI nr Bases de datos no redundantes del Centro nacional de información biotecnológica

PDB Protein Data Bank

pI Punto isoeléctrico

ROS Especies reactivas de oxígeno

SDS Disulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con disulfato de sodio

TE Trofoectodermo

TFA Ácido trifluoroacético

TOF Tiempo de vuelo

UPV Universidad Politécnica de Valencia

WR Working Reagent

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) COMO MODELO ANIMAL

El conejo es el tercer mamífero más utilizado en investigación en la Unión Europea (2,7%), por detrás del ratón (59,3%) y la rata (17,7%) (EU Report 2010). Actualmente, es un modelo animal cuyos usos más clásicos son la producción de anticuerpos, el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, y el estudio de la fisiología y la toxicidad de nuevos fármacos (Shiomi e Ito, 2009). También es utilizado en el estudio de enfermedades cardiovasculares y en investigaciones oncológicas humanas (Fischer *et al.*, 2012). A finales del siglo XIX, debido a sus características reproductivas, el conejo comenzó a ser utilizado como el mamífero clásico en embriología y biología reproductiva (Viebahn, 2001). El conejo se caracteriza por no presentar anoestro estacional, poseer un ciclo reproductivo corto (alrededor de 30 días), y por ser una especie de ovulación inducida por el macho durante el coito, lo cual permite conocer la cronología del desarrollo embrionario con precisión (Tao y Niemann, 2000). Además, las etapas de gastrulación y morfología se conocen con detalle, y el desarrollo del embrión *in vitro* hasta el noveno día presenta estructuras y fases muy parecidas a las del embrión humano (Hohn *et al.*, 1992). El tamaño de esta especie hace que sea un animal de fácil manejo y esto permite monitorear el embrión durante la gestación, lo cual convierte al conejo en un modelo ideal para observar efectos a corto y largo plazo del desarrollo embrionario y fetal en la descendencia y los individuos adultos (Enders y Blankenship, 1999; Duranthon *et al.*, 2012). Por otro lado, la morfología del aparato reproductor femenino constituido por un útero de doble cérvix permite realizar estudios embrionarios sobre el mismo animal con ambientes uterinos diferentes (Fischer *et al.*, 2012).

1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO Y FETAL

Como se ha descrito anteriormente, el conejo es una especie de ovulación inducida (Tao y Niemann, 2000). Tras 10 horas desde dicho proceso tiene lugar la fecundación y entre 2 y 4 horas después aparece el segundo corpúsculo polar (Harper, 1961). Los eventos que tienen lugar en las fases preimplantacionales pueden alterar procesos posteriores del desarrollo puesto que durante dicho periodo se produce la activación del genoma del embrión (aproximadamente en el estadio de 8 células), la compactación de la mórula (aproximadamente 68 horas después del coito), y la diferenciación de las líneas celulares y la formación del blastocelo en el blastocisto (72 horas después del coito) (Fischer *et al.*, 2012; Lavara *et al.*, 2014). Esta estructura está formada por dos líneas celulares: la masa celular interna (ICM), la cual conserva su pluripotencialidad para generar cualquier tejido del embrión, y las células del trofoectodermo (TE) que permitirán la implantación exitosa por

medio de la placenta al contactar con el endometrio (Sáenz-De-Juano, 2010). Posteriormente el blastocisto se expande y adquiere diferentes envueltas hasta que aproximadamente el día 6 comienza el proceso de gastrulación y se inicia la formación del eje central y las capas germinales (Fischer *et al.*, 2012) (Figura 1).

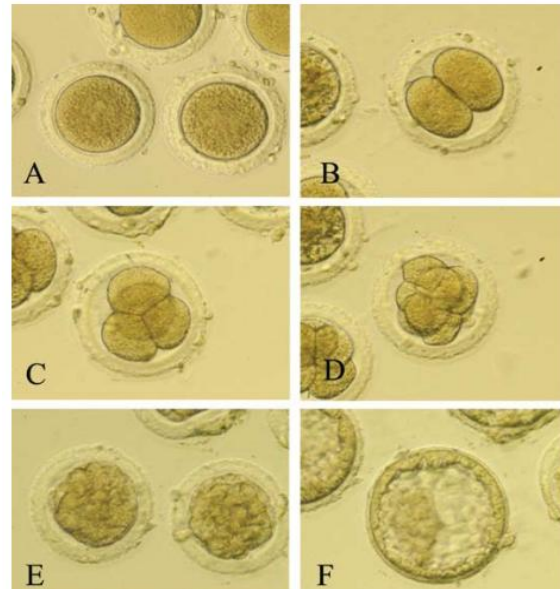


Figura 1. Desarrollo embrionario temprano. A: estado pronuclear. B: embrión de 2 células. C: embrión de 4 células. D: embrión de 8 células. E: mórula. F: blastocisto expandido (Sultana *et al.*, 2009).

El inicio de la gastrulación se caracteriza por la aparición de una zona densa en forma de media luna en la parte anterior del disco embrionario, y aproximadamente 6 h más tarde se produce la reducción de la densidad a través de un alargamiento en forma de hoz en el polo posterior (Fischer *et al.*, 2012) (Figura 2).

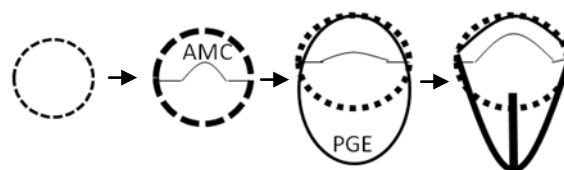


Figura 2. Desarrollo embrionario desde el estadio de blastocisto hasta el comienzo de la gastrulación (adaptada de Fischer *et al.*, 2012).

Aproximadamente 18 horas después del inicio de la gastrulación aparece el nodo de Hensen, y comienza la implantación (Fischer *et al.*, 2012), fase en la cual el embrión contiene unas 255000 células (Daniel, 1964) y unos 6 mm de diámetro (Morgan y Kane, 1993). El éxito en el establecimiento y mantenimiento de la gestación necesita de una comunicación constante entre la madre y el

embrión a través de la placenta (Vicente *et al.*, 2013). Esta comunicación se lleva a cabo mediante secreciones embrionarias para el reconocimiento de la gestación, y a través de la secreción y el remodelado del epitelio uterino para mantener el desarrollo y crecimiento embrionario.

A los 8 días post-coito, las células del TE generan grandes proyecciones que se adhieren y fusionan con la superficie epitelial apical para continuar con la implantación (Fischer *et al.*, 2012). La placenta de conejo se desarrolla en forma discoidal, cuya estructura es similar a la humana durante el último trimestre de la gestación, así como también son similares los cambios hemodinámicos que se llevan a cabo (Fischer *et al.*, 2012). Las células gigantes presentes en la placenta de conejo a día 10 tras el coito están involucradas en el remodelado de las células endoteliales de algunas arterias (Larsen, 1962). Además, se ha comprobado que existe una correlación entre la expresión de genes del sistema renina-angiotensina de la placenta y ciertos cambios hemodinámicos (McArdle *et al.*, 2009). El desarrollo de la placenta fetal (Figura 3) finaliza aproximadamente en el día 12 de gestación (Adams, 1960).



Figura 3. Estructuras feto-placentarias en día 14 de gestación (Sáenz-De-Juano, 2014).

1.3. EFECTOS SOBRE LA REPROGRAMACIÓN EMBRIONARIA

Durante el desarrollo del conejo, cada uno de los eventos que suceden se regula por ARNs y proteínas de la madre durante la formación de los gametos, y por el núcleo embrionario una vez que éste se activa (Léandri *et al.*, 2009). Los embriones preimplantacionales de mamífero son sensibles a las condiciones ambientales que ocurren durante su desarrollo, como el ambiente en el tracto reproductivo de la madre, pero se ha observado que estos son capaces de adaptarse por medio de mecanismos que pueden implicar problemas en el desarrollo fetal y postnatal (Fleming *et al.*, 2004). Por tanto, cualquier evento que ocurre durante períodos tempranos críticos en la vida del individuo

puede alterar la estructura del órgano afectado y modificar su función en respuesta a los factores del entorno (Hochoer, 2014). También se ha demostrado que las interacciones feto-placentarias son esenciales para la modulación del efecto temprano del medio ambiente (Fischer *et al.*, 2012).

Durante el desarrollo *in vivo* e *in vitro* de los embriones se modifican los niveles de moléculas como aminoácidos y/o reguladores metabólicos entre otros, desencadenando una cascada de consecuencias a corto y largo plazo (Fleming *et al.*, 2004). A corto plazo las células sufren modificaciones epigenéticas, alteraciones en la transmisión de la señal intracelular, estrés metabólico, cambios en la expresión genética, apoptosis o trastornos en la proliferación celular. A largo plazo se observa la reducción en la capacidad de implantación, desajustes entre el feto y la placenta, la alteración del suministro materno de nutrientes, y la aparición de enfermedades cardiovasculares y metabólicas principalmente en el individuo adulto (Sáenz-De-Juano, 2014). Estas consecuencias han generado la hipótesis de la “enfermedad de origen fetal”, la cual defiende que problemas en la descendencia adulta como la hipertensión, la resistencia a la insulina o el aumento de las enfermedades cardiovasculares e inmunes tienen su origen en la adaptación del feto a los cambios en el ambiente causados por una baja nutrición materna o por insuficiencia placentaria (Hochoer, 2014). Además, esta hipótesis sostiene que puede darse una reprogramación fetal avanzada, en la que un gen de los progenitores puede influir en la fisiología de la descendencia sin estar presente en el individuo.

El periodo periconcepcional durante el desarrollo embrionario es particularmente sensible a la disrupción metabólica debido a la plasticidad de las células implicadas en la interacción embrionaria-materna (Sáenz-De-Juano, 2014). En los entornos hiperglicémicos se ha observado una disminución en la capacidad de implantación, además de la degradación de la cromatina y la reducción del número de células en el blastocisto, lo cual retrasa el crecimiento fetal y conlleva fallos en la placenta (Fleming *et al.*, 2004). Otro ejemplo son los tratamientos de superovulación empleados en las técnicas de reproducción asistida, ya que provocan una disminución de tamaño y un retraso del desarrollo embrionario, así como una mayor mortalidad embrionaria entre otros efectos debido a alteraciones epigenéticas en los ovocitos (Lonergan *et al.*, 2007).

La nutrición recibida a través del ambiente intrauterino regula la función de ciertos tejidos con actividad metabólica en la etapa postnatal, por lo que una restricción calórica y nutricional en el útero puede incrementar los niveles de leptina placentaria reguladora de la placentación y el desarrollo fetal (Ramírez-Vélez, 2012). Por un lado, este incremento está asociado a la obesidad y al síndrome metabólico de la edad adulta. Por otro lado, la malnutrición puede disminuir el peso y la

altura de la descendencia en el nacimiento y se incrementa el riesgo a padecer hipertensión arterial, el síndrome metabólico o enfermedades cerebrovasculares (Ramírez-Vélez, 2012). Además de la nutrición, otros factores como la exposición prenatal a cafeína o etanol provocan modificaciones epigenéticas que generan un retraso en el crecimiento intrauterino y un aumento en la susceptibilidad a sufrir el síndrome metabólico (Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Se ha comprobado que estos efectos son transgeneracionales y no sólo afectan a la primera línea de la descendencia sino que también pueden afectar a generaciones posteriores, así como también se ha comprobado que existen diferencias entre individuos de distinto sexo (Lavara *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014).

La exposición a cafeína, etanol o humo de tabaco puede provocar la desregulación del eje hipotálamo-pituitaria-adenocortical (HPA) en la descendencia, lo que implicaría una alteración a nivel del epigenoma, derivando en problemas en el sistema neuroendocrino como trastornos en la conducta o déficit de atención (Shen *et al.*, 2014; Stroud *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Además, la exposición al alcohol o la nicotina durante la segunda mitad del periodo prenatal y el inicio del periodo postnatal influye en el desarrollo de las neuronas, la coordinación motora o el equilibrio, ya que ambas sustancias atraviesan la barrera placentaria y al entrar en el embrión generan un ambiente de estrés oxidativo (Li y Wang, 2004). El eje HPA también puede verse modificado por alteraciones hormonales durante periodos específicos de la gestación, y esto puede hacer que la descendencia tenga una mayor predisposición a sufrir enfermedades cardiovasculares (Goldstein *et al.*, 2014).

1.3.1. EFECTOS SOBRE EL HÍGADO

Como se ha dicho anteriormente, el comportamiento y la nutrición de la madre es determinante en la salud de la descendencia (Fleming *et al.*, 2004). Un estudio reciente en ratón ha examinado las posibles alteraciones en las proteínas metabólicas del hígado en función de la exposición al humo del tabaco (Canales *et al.*, 2012). Las toxinas que presenta el humo de los cigarrillos tienen una alta solubilidad en agua y un bajo peso molecular, lo que permite su transferencia desde la placenta al feto (Zdravkovic *et al.*, 2005). Los tejidos de rápida proliferación presentes en el feto o los neonatos son realmente sensibles a los productos químicos que contiene el humo del tabaco, y el hígado, al ser la primera línea de desintoxicación y metabolización, se ha comprobado que presenta toxicidad tras la exposición a dichas toxinas (Izzotti *et al.*, 2003).

Canales *et al.* (2012) comprobaron que durante el periodo de exposición, se observaba un retraso en el crecimiento fetal y postnatal, así como se vieron alteradas diferentes rutas metabólicas de la descendencia, entre las que se incluyen el metabolismo de lípidos y glucosa, la muerte celular y las respuestas inmunes. Del mismo modo, concluyeron que tanto estas modificaciones como la presencia de daños genotóxicos y la alteración de la transcripción y la expresión génica, están relacionados entre sí y son causados por la exposición embrionaria al humo de tabaco.

La exposición al humo de tabaco y alcohol pueden desencadenar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) debido a alteraciones en la síntesis de lípidos que producen su acumulación en el hígado (Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). La ingesta de cafeína induce altos niveles de glucocorticoides que también alteran la función metabólica de la glucosa y los lípidos, aumentando a su vez los niveles de la enzima fosfoenolpiruvato carboxikinasa presente en el hígado, involucrada en el proceso de gluconeogénesis (Luo *et al.*, 2014).

1.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR DE PROTEÍNAS

Los procesos biológicos pueden ser descritos basándose en la comparación global y cuantitativa de los patrones de expresión de células o tejidos que representan diferentes estadios, y un tipo de análisis global de la expresión a nivel de proteínas es la proteómica (Gygi *et al.*, 2000). En proteómica existen diferentes técnicas y metodologías, entre las que se encuentra la electroforesis bidimensional convencional en gel (2-DE), una técnica de proteómica cuantitativa que posee gran aplicabilidad a las muestras biológicas disponibles (Laborde *et al.*, 2011).

1.4.1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL CONVENCIONAL EN GEL

La 2-DE es una técnica que proporciona un mapa bidimensional de proteínas en el que se puede observar los cambios de expresión, las isoformas de dichas proteínas y las posibles modificaciones post-traduccionales que sufran, y por ello se considera la madre de la proteómica (Rabilloud y Lelong, 2011).

Esta técnica de separación de proteínas tiene lugar en dos fases (Laborde *et al.*, 2011). La primera etapa consiste en una separación de las proteínas por su punto isoelectrico mediante isoelectroenfoque (IEF) en la que la mezcla con las proteínas solubilizadas se separa en un gradiente de pH, generalmente de 3 a 10, por medio de tiras comerciales cubiertas por un gel de acrilamida. La

segunda etapa consiste en una separación de las proteínas según su masa molecular en una electroforesis SDS-PAGE tras cargar la tira que contiene las proteínas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, de manera que se obtiene un mapa bidimensional que podrá ser visualizado por distintas técnicas (Figura 4).

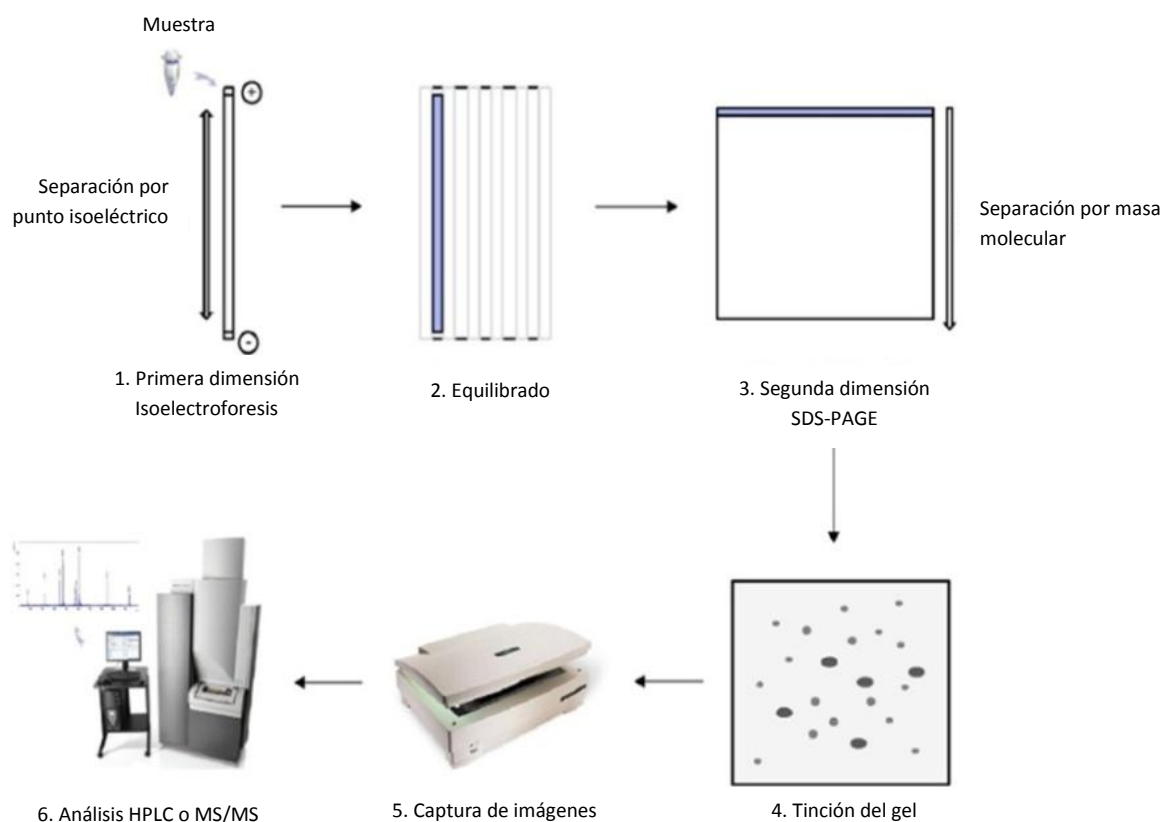


Figura 4. Esquema de los pasos de la electroforesis bidimensional convencional en gel de poliacrilamida (2-DE) (adaptada de Laborde *et al.*, 2011).

Posteriormente las proteínas se visualizan por distintas técnicas de tinción como la tinción con plata o azul de Coomassie, y son escaneadas con programas específicos de análisis de imágenes (Laborde *et al.*, 2011). La utilización de la separación en 2-DE está muy extendida debido a que es una técnica robusta, reproducible, económica y sencilla de realizar (Rabilloud y Lelong, 2011), pese a que tiene desventajas como el desplazamiento de proteínas distintas al mismo punto del gel por distintas razones (procesamiento diferencial de las proteínas o modificaciones post-traduccionales) (Gygi *et al.*, 2000). Los puntos más representativos posteriormente pueden ser identificados por técnicas como la espectrometría de masas (MS) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Perkins *et al.*, 1999).

1.5. LA CRIOCONSERVACIÓN EMBRIONARIA

La crioconservación de embriones es considerada una herramienta importante en el área de la reproducción humana asistida y en la conservación de líneas específicas de mamíferos para evaluar la mejora genética, minimizar el impacto de la deriva genética o facilitar la difusión interterritorial de líneas y preservar las especies en extinción (Lavara *et al.*, 2011). Fue una técnica considerada hasta hace poco tiempo como neutral puesto que pese a que podía tener efectos letales en algunos embriones, aquellos que sobrevivían a este proceso no se veían alterados (Auroux *et al.*, 2004). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la crioconservación parece tener efectos sobre los individuos (Dobrinsky, 1996; Auroux *et al.*, 2004; Tatone *et al.*, 2010; Lavara *et al.*, 2014; Sáenz-De-Juano *et al.*, 2014).

El principal objetivo de la crioconservación embrionaria es mantener las características embrionarias a largo plazo mediante la utilización de bajas temperaturas, y para ello es necesario eliminar las dos principales causas que provocan la muerte celular en este proceso: la formación de cristales y la concentración de solutos (Saragusty *et al.*, 2009). Esta eliminación permite mantener la integridad celular y reanudar el funcionamiento biológico adecuado después de la descongelación. Algunas variables que determinan el éxito de la crioconservación son el tipo celular, la naturaleza y concentración de crioprotectores, el ratio de enfriamiento, la temperatura mínima a la que se someten, el ratio de descongelación o las condiciones de eliminación de los crioprotectores (Sáenz-De-Juano, 2014). También influyen en el proceso factores intrínsecos como las propiedades criobiológicas de las membranas celulares, y extrínsecos como la adaptación del protocolo a cada uno de los estadios del desarrollo embrionario (Vanderzwalmen, 2012).

1.5.1. MÉTODOS DE CRIOCONSERVACIÓN

En 1949, Polge *et al.* descubrieron por error las propiedades crioconservadoras del glicerol, momento en el cual surgió la congelación lenta como técnica de crioconservación (Polge *et al.*, 1949). Años después, en 1972 aparece el primer ratón vivo procedente de un embrión congelado (Whittingham *et al.*, 1972; Wilmut, 1972). En 1985 aparece un nuevo método para la crioconservación de embriones, la vitrificación (Rall y Fahy, 1985). Hasta la fecha, la congelación lenta y la vitrificación son técnicas habituales empleadas en la crioconservación de gametos, las cuales difieren en la composición y concentración de los crioprotectores utilizados y los ratios de enfriamiento (Vatja y Kuwayama, 2006). Sin embargo, aunque estos métodos son diferentes entre sí,

ambos proporcionan resultados similares en la crioconservación de embriones mamíferos (Leibo, 2012).

Por un lado la congelación lenta utiliza pequeñas cantidades de crioprotectores, y durante muchos años fue el método elegido para la crioconservación de embriones, y por otro lado, la velocidad de enfriamiento es mucho más lenta, entre 0'5°C y 2°C/minuto (Leibo, 2008). En el proceso de congelación lenta, a medida que se disminuye la temperatura se forma hielo extracelular que hace que la célula pierda agua gradualmente y se contraiga, de manera que cuando la célula está lo suficientemente deshidratada el contenido intracelular solidifica formando cristales que no afectan letalmente a la célula (Leibo y Songsasen, 2002). Las desventajas técnicas que presenta la congelación lenta son que necesita más tiempo, equipamiento más sofisticado para controlar la velocidad de enfriamiento, y experiencia para realizarla correctamente (Saragusty y Arav, 2011).

La vitrificación es un método que utiliza concentraciones mayores de crioprotectores y es un proceso mucho más rápido, ya que generalmente la muestra es directamente sumergida desde temperatura ambiente a nitrógeno líquido (Leibo, 2008; Arav, 2014). Las células se deshidratan osmóticamente antes del enfriamiento por una solución altamente concentrada de crioprotectores, la cual parece ser perjudicial debido a la toxicidad química y el efecto osmótico a los que se ven sometidos las células (Vajta y Kuwayama, 2006). Por ello, la solución que contiene la muestra no cristaliza, sino que pasa a un estado vítreo amorfo estable (Figura 5), evitando la formación de cristales de hielo intra y extracelulares y manteniendo la distribución molecular (Fahy *et al.*, 1984; Rall y Fahy, 1985; Fahy, 1986; Dobrinsky, 1996).

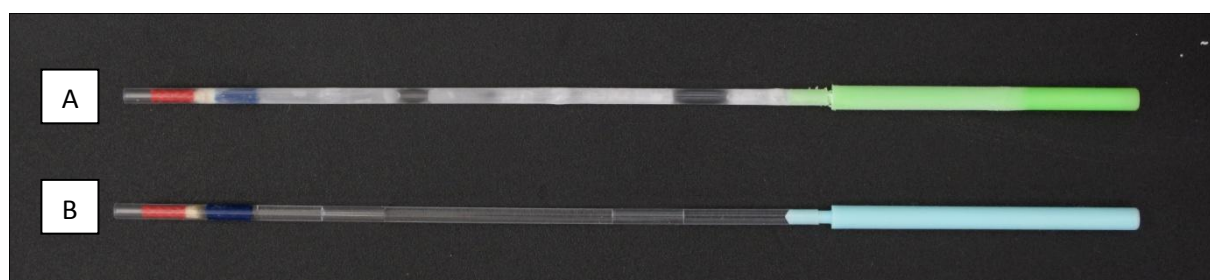


Figura 5. Estado cristalino generado por congelación (A) y estado vítreo amorfo estable generado por vitrificación (B).

La vitrificación es una técnica simple, más rápida y económica que la congelación lenta, y por ello desde su descubrimiento se ha estudiado a fondo y se ha esforzado en disminuir la toxicidad de los crioprotectores usando combinaciones de estos (Saragusty y Arav, 2011).

1.5.2. ALTERACIONES CAUSADAS POR LA CRIOCONSERVACIÓN

Los cinco pasos críticos de la crioconservación (exposición a crioprotectores, enfriamiento por debajo de 0°C, almacenamiento a temperaturas por debajo de la transición vítrea del agua, calentamiento, y eliminación de crioprotectores) hacen que los embriones queden expuestos a cambio biofísicos y térmicos que pueden afectar a su viabilidad por el daño osmótico, la formación de cristales de hielo y la toxicidad de los crioprotectores (Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, además de los crioprotectores (Fahy *et al.*, 2004), el daño celular depende de otros factores determinados por el protocolo (medio, almacenamiento y velocidad de congelación y descongelación), la especie, el estadio del desarrollo embrionario y si el embrión se desarrolló *in vitro* o *in vivo* (Marco-Jiménez *et al.*, 2013).

La membrana celular plasmática es sensible al enfriamiento y puede dañarse durante la crioconservación, pero se puede aumentar su fluidez para reducir dicha sensibilidad (Zeron *et al.*, 2002). Sin embargo, al igual que los lípidos protegen a la membrana del daño causado por la crioconservación (Saragusty y Arav, 2011), en los estadios tempranos del embrión hace que sean más susceptibles a las lesiones por bajas temperaturas, pudiendo desestructurar los microtúbulos y microfilamentos (Dobrinsky, 1996).

Debido a la toxicidad y los cambios osmóticos, los crioprotectores pueden inducir daños en el citoesqueleto y por eso se considera la principal barrera de la crioconservación en general y de la vitrificación en particular, debido a la gran cantidad de crioprotectores que se utilizan (Dobrinsky, 1996). Durante la congelación lenta es difícil eliminar por completo los daños ocasionados por la formación de cristales, sin embargo durante la vitrificación no se forman cristales y los daños que se generan son menores (Sáenz-De-Juano, 2014).

Se sabe que la crioconservación de embriones induce la alteración de su expresión génica, reduciendo el desarrollo temprano fetal y aumentando las pérdidas fetales, al igual que se ve alterada la formación de la placenta (Mocé *et al.*, 2010; Marco-Jiménez *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2013; Lavara *et al.*, 2014). Sin embargo poco se sabe hasta la fecha sobre los efectos a largo plazo en los individuos adultos y en la descendencia, y según nuestro conocimiento, nada se ha investigado sobre las repercusiones en el hígado en los conejos adultos (Liu *et al.*, 2013).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la vitrificación de embriones tempranos induce alteraciones proteicas a largo plazo en el hígado de individuos adultos y por consiguiente, si puede ser considerada una técnica neutral o no.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para realizar el estudio se utilizaron muestras obtenidas de conejos pertenecientes a la línea blanca de conejo neozelandés del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) (Figura 6). El Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Politécnica de Valencia aprobó este estudio. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con los principios de cuidados animales publicados en el Real Decreto Español 53/2013 (BOE, 2013; BOE= Boletín Oficial del Estado).



Figura 6. Línea blanca de conejo neozelandés del ICTA.

Se emplearon 10 muestras de hígado de individuos adultos (8 meses), 5 de ellas procedentes de embriones frescos y 5 procedentes de embriones vitrificados. Las hembras donantes fueron inseminadas artificialmente y a las 72 horas post-inseminación (día 3) se sacrificaron con 0'6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Madrid, España) y se recuperaron los embriones por perfusión de los oviductos con tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) suplementado con 0'2% (v/v) de albúmina sérica bovina (BSA). Los embriones fueron vitrificados utilizando la metodología descrita por Vicente *et al.* (1999), y transferidos por laparoscopia siguiendo el procedimiento de Besenfelder y Brem (1993). La descendencia fue alimentada durante las 4 primeras semanas en la jaula de la madre y posteriormente se trasladaron a jaulas individuales con libre acceso a agua y un fotoperiodo de 8 horas de luz alternadas con 16 horas de oscuridad. Finalmente, la descendencia fue seguida hasta la edad adulta (8 meses) y sacrificada con 0'6 g de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A.), obteniéndose posteriormente las muestras de hígado (Figura 7).



Figura 7. Hígado extraído de los conejos a partir del cual se realizó el análisis proteómico.

3.2. EXTRACCIÓN PROTEICA Y CUANTIFICACIÓN

Las proteínas fueron extraídas del tejido hepático por homogeneización con bolas metálicas mediante el homogeneizador Fast-Prep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Francia) en una relación 200:1 de tampón RIPA (SIGMA, Madrid, España) para lisar las células y enzimas antiproteasas para prevenir la proteólisis y mantener la fosforilación de las proteínas. La homogeneización se realizó a velocidad máxima (6'5 m/s) durante 60 segundos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en hielo durante 20 minutos y centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos, a 4°C. El sobrenadante se diluyó con suero fisiológico hasta una dilución 1:25 para que la medida de la concentración con el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Madrid, España), el cual está basado en el método de Bradford, quedase dentro de la recta de calibrado. Esta recta se preparó con stock de BSA diluida en suero fisiológico según los volúmenes indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los patrones de BSA para realizar la curva patrón.

PATRÓN	VOLUMEN SUERO (μ L)	VOLUMEN BSA (μ L)	CONCENTRACIÓN FINAL BSA (μ g/mL)
A	0	300 stock	2000
B	125	375 stock	1500
C	325	325 stock	1000
D	175	175 patrón B	750
E	325	325 patrón C	500
F	325	325 patrón E	250
G	325	325 patrón F	125
H	400	100 patrón G	25
I	400	0	0 = blanco

A continuación se preparó el BCA *Working Reagent* (WR) y se añadió a cada una de las muestras y de los patrones en una relación 1:20 (muestra/patrón: WR). Se incubaron 30 minutos a 37°C y la concentración de proteínas fue medida en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.3. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Para llevar a cabo el análisis proteómico (Figura 8) se realizó una separación por electroforesis bidimensional, cuya primera fase fue la separación por el punto isoeléctrico, y la segunda separación se realizó en función de la masa molecular.

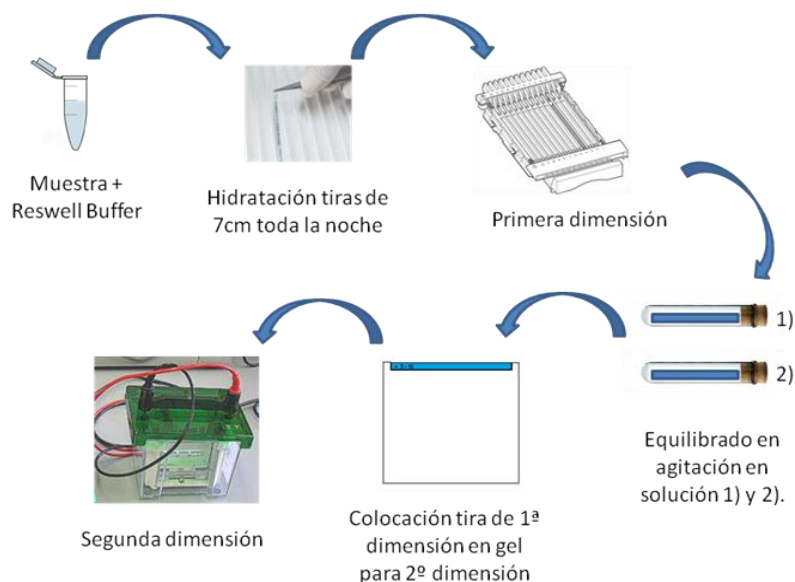


Figura 8. Diseño experimental.

3.3.1. HIDRATACIÓN DE LAS TIRAS DE ELECTROFORESIS

En la primera dimensión se utilizaron tiras de 7 cm de longitud con un gradiente inmovilizado de pH de 3 a 10 (Bio-Rad, Madrid, España). Estas tiras fueron rehidratadas a temperatura ambiente durante toda la noche con una cantidad de 200 µg de proteína ajustada con Reswell Buffer (Bio-Rad). Todos los pasos de la electroforesis bidimensional se realizaron utilizando el Protean i12 IEF cell (Bio-Rad) (Figura 9).



Figura 9. Protean i12 IEF cell de Bio-Rad utilizado para realizar las electroforesis bidimensionales.

3.3.2. SEPARACIÓN POR ISOELECTROENFOQUE Y EQUILIBRADO DE LAS TIRAS

Tras la rehidratación se realizó la primera dimensión de la electroforesis en un programa de 4 pasos: rampa rápida hasta 250V en 15 minutos, rampa gradual hasta 4000V en una hora, rampa rápida hasta 4000V a una velocidad de 15000V/h, y mantener a 500V. Posteriormente las tiras fueron equilibradas durante 15 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de agitación en cada una de las 2 soluciones de equilibrio (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de las soluciones de equilibrio 1 y 2.

	SOLUCIÓN 1	SOLUCIÓN 2
UREA	6M	6M
SDS	0'35M	0'35M
GLICEROL	87%	87%
TRIS pH 8'8	1'5M	1'5M
DTT	65mM	-
ODOACETAMIDA	-	270mM
AGUA miliQ	1 L	1 L

3.3.3. SEGUNDA DIMENSIÓN

Una vez finalizado el equilibrio de las tiras, la segunda dimensión de la electroforesis se realizó en geles homogéneos prefabricados de poliacrilamida al 12% (Bio-Rad) usando una cubeta de electroforesis vertical (Bio-Rad). La manera de proceder fue la siguiente: se colocó la tira equilibrada en el gel con el polo positivo en el lado izquierdo y se cubrió con 1 mL de agarosa al 0'5% con *Running Buffer* 1X (Tabla 3) y azul de bromofenol, indicador del desplazamiento de la muestra durante la electroforesis. Una vez que se colocó el gel en la cubeta, ésta se rellenó con 500mL de *Running Buffer* y se corrió durante 9'5 minutos a 50V hasta que la línea de la muestra bajó completamente desde la tira hasta el gel, y finalmente se corrió entre 30-45 minutos a 200V hasta que la muestra se desplazó por todo el gel.

Tabla 3. Composición *Running Buffer*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
TRIZMA	25 mM
GLICINA	0'19 M
SDS	3 mM
AGUA miliQ	1L

3.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

3.4.1. TINCIÓN

Para identificar las proteínas de interés, una vez finalizada la electroforesis las proteínas se fijaron durante 15 minutos en solución de fijación (relación 1:4:5 de ácido acético 100%: etanol 100%: agua miliQ), y posteriormente se realizó un lavado con agua miliQ durante 1 minuto y se tiñeron los geles durante toda la noche en QC Colloidal Comassie Stain (Bio-Rad). Al día siguiente se realizó la destinción con 3 horas de lavados en agua miliQ, la cual se cambió cada hora.

3.4.2. DETECCIÓN

Los geles fueron escaneados y analizados mediante el software ProteinPilot v4.5. search engine (ABSciex, Barcelona, España). Se seleccionó un gel como referencia para superponer con el resto de manera automática y después se corrigió de manera manual. Las proteínas de los spots se emparejaron en los 6 geles y los volúmenes disponibles, definidos como la relación entre la cantidad de proteínas en la imagen de referencia y la cantidad de la misma proteína en la imagen de la muestra, se normalizaron dividiendo el volumen bruto de cada punto en un gel por el volumen total de puntos válidos en el gel.

3.4.3. IDENTIFICACIÓN

La identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en las muestras vitrificadas respecto al grupo control se realizó por cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Las proteínas fueron cortadas de los geles y lavadas. Posteriormente, las muestras se digirieron con tripsina (Promega, Madrid, España) según el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996) y la digestión se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) al 1%, concentrando los péptidos digeridos en un volumen de 7 µL. Para el control de la digestión se analizó BSA con el mismo procedimiento.

Previamente a realizar el análisis por MALDI TOFTOF se realizó el calibrado de la placa y los métodos de adquisición con mix de calibrado CM5 (ABSciex). Las mezclas obtenidas fueron analizadas en un 5800 MALDI TOFTOF (ABSciex) en el modo de reflectrón positivo. Cinco de los precursores más intensos (de acuerdo a los criterios establecidos: mínimo ruido de fondo 10, área mínima 500, máxima separación del precursor 200 ppm, máxima separación de la fracción 4) se seleccionaron para cada posición para el análisis MS/MS, cuyos datos fueron adquiridos usando el método 1kV MS/MS por defecto. La información obtenida se envió al software MASCOT (Matrix-Science, Londres, Reino Unido).

Un volumen de 5 µL de cada muestra se cargaron en una columna preparativa (NanoLC Column, 3 µm C18-CL, 350 µm x 0'5 mm; Eksigent, Madrid, España), y se retiraron las sales con TFA al 0'1% a una velocidad de flujo de 3 µL/minuto durante 5 minutos. A continuación los péptidos se cargaron en una columna analítica (LC Column, 3µm C18-CL, 75 µm x 12 cm, Nikkyo, Tokio, Japón) equilibrada en acetronitrilo (ACN) al 5% y ácido fórmico (FA) al 0'1%. La elución se realizó con un gradiente lineal del 5 al 45% de B en A durante 15 minutos (A: FA 0'1%; B: ACN, FA 0'1%) a una velocidad de flujo de 300 nL/minuto. Posteriormente los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI-qTOF (5600 TripleTOF, ABSciex). El TripleTOF se realizó en un análisis TOF MS de 0'25 segundo de 350 a 1250 m/z, seguido de un análisis de los iones más intensos de 0'05 segundos de 100 a 1500 m/z. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma de picos.

A continuación se empleó el software MASCOT (Matrix-Science) como motor de búsqueda de los espectros en la bases de datos Expsy y NCBI nr con una especificidad determinada, permitiendo una diferencia en la secuencia y una tolerancia en la medición de la masa de 100 ppm en el modo de MS y 0'8 Da en el modo de iones MS/MS. El análisis proteómico fue realizado por la Unidad de

Proteómica SCSIE de la Universidad de Valencia, miembro de la ISCIII ProteoRed Proteomics Platform.

3.5. ANOTACIÓN FUNCIONAL

Las secuencias de aminoácidos se adquirieron en formato FASTA para añadirse posteriormente al software BLAST2GO versión 2.7.1., y la anotación funcional se realizó mediante un BLASTP en la NCBI nr con los parámetros por defecto.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la detección de las proteínas estadísticamente significativas se utilizó el software Protein Pilot v4.5. Con los datos obtenidos se realizó un test ANOVA y se calcularon los p-values, tomándose como valor significativo aquellos p-value por debajo de 0'05.

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS MEDIANTE 2-DE

Tras realizar la electroforesis de 2 dimensiones, para llevar a cabo el análisis se utilizaron los 3 geles de cada grupo de muestras con mayor calidad. Dicho análisis reveló un total de 646 spots presentes en hígado (Figura 10).

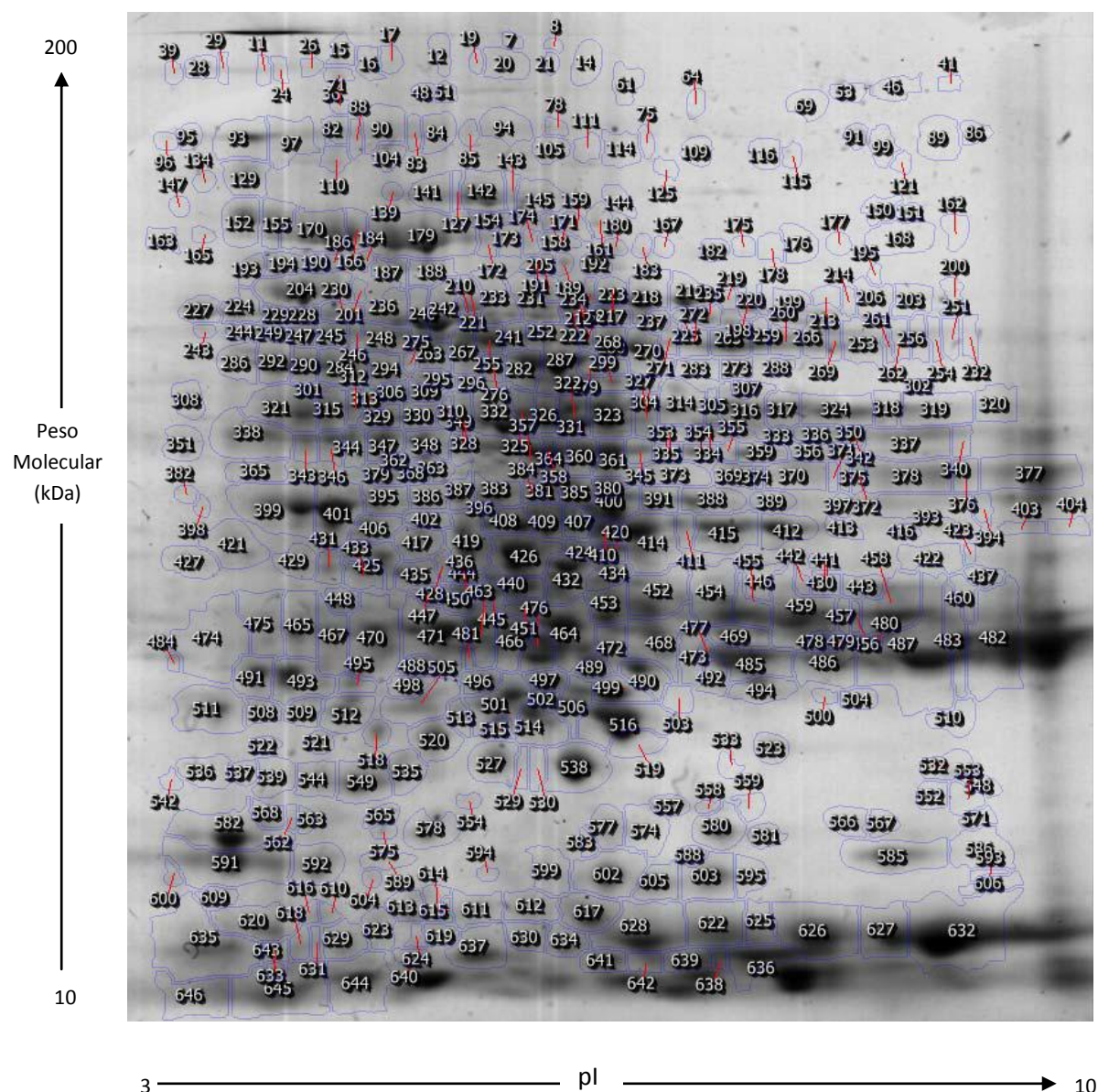


Figura 10. Superposición de geles con todas las proteínas encontradas en hígado.

De los 646 spots detectados, 9 estaban diferencialmente expresados. De estos, 4 estaban sobreexpresados en las muestras de hígado procedentes de embriones vitrificados y 4 subexpresados. De todos los spots significativamente detectados, el spot 487 fue descartado de los análisis posteriores debido al exceso de área detectada (Figura 11). La Figura 11 muestra la localización de los spots diferencialmente expresados en el gel y su valor de *fold change* (los valores positivos representan los spots sobreexpresados mientras que los valores negativos hacen referencia a los spots subexpresados).

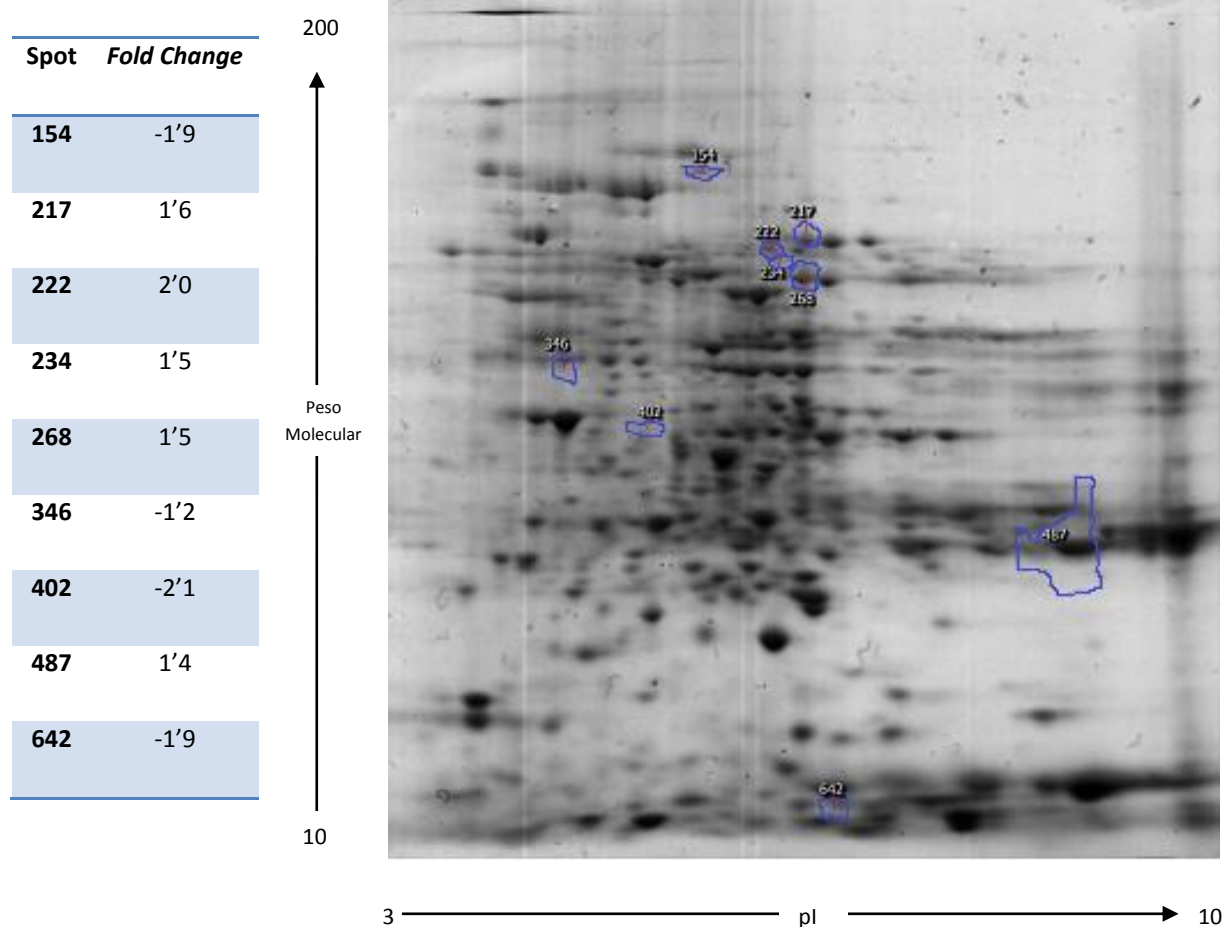


Figura 11. Localización de los spots diferencialmente expresados en el gel bidimensional y valor de *fold change*.

La Figura 12 muestra las diferencias detectadas en el área del gel, tanto la de los spots subexpresados (154, 346, 402 y 642) como la de los sobreexpresados (217, 222, 234 y 268).

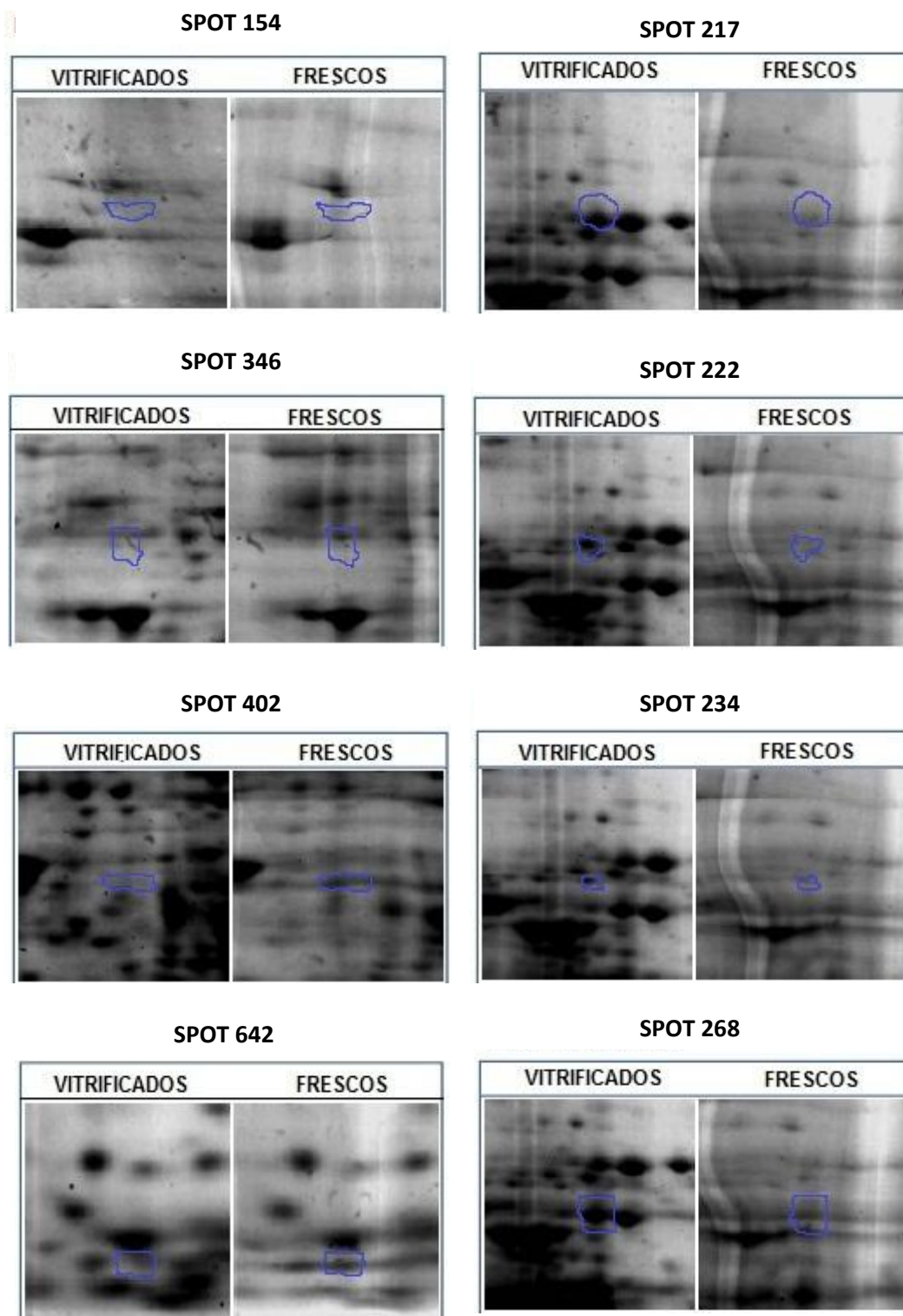


Figura 12. Áreas marcadas en los geles de los spots subexpresados (154, 346, 402 y 642) y sobreexpresados (217, 222, 234 y 268).

Tabla 4. Información descriptiva de las 23 proteínas de los spots diferencialmente expresados con mezclas tras su análisis mediante espectrometría de masas.

SPOT	NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO DE ACCESO	FOLD CHANGE	PESO MOLECULAR TEÓRICO (kDa)	pl TEÓRICO	PÉPTIDOS ALINEADOS	SECUENCIA IDENTIFICADA (%)	DESCRIPCIÓN
154	CPS1	gi 291392165	-1'9	16'6	6'8	15	11'61	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial
	TRF	gi 6175087	-1'9	76'7	6'8	13	17'7	Liver transferrin (TRF)
222	CAT	gi 291384816	2	59'7	7'4	17	33'78	Catalase
	UGDH	gi 291385671	2	53'7	6'7	19	35'02	UDP-glucose 6-dehydrogenase
	PDIA5	gi 291400533	2	60	7'6	10	16'72	Protein disulfide isomerase family A, member 5
	ALDH6A1	gi 291406779	2	61'5	8'4	12	22'33	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
234	UGDH	gi 291385671	1'5	53'7	6'7	17	32'79	UDP-glucose 6-dehydrogenase
	CAT	gi 291384816	1'5	59'7	7'4	16	32'83	Catalase
	DLD	gi 504179583	1'5	54'3	7'5	18	31'83	Dihydrolipoamide dehydrogenase
	LAP3	gi 291385575	1'5	56'3	8'7	14	28'90	Leucine aminopeptidase 3
	ALDH6A1	gi 291406779	1'5	61'5	8'4	12	21'01	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
	GLUD1	gi 504141895	1'5	49'5	7'7	12	27'01	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
	ALDH1A1	gi 42558920	1'5	53'9	7'9	12	24'60	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
268	GLUD1	gi 507548515	1'5	49'5	7'7	35	49'91	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
	ALDH1A1	gi 42558920	1'5	53'9	7'9	28	43'15	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
	ATP5A1	gi 291394323	1'5	59'8	9'5	11	22'78	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
346	GALK1	gi 291413443	-1'2	42'9	5'3	20	40'56	Galactokinase 1
	HAO1	gi 291389051	-1'2	40'9	5'9	15	34'59	Hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 1
402	LOC100345202	gi 291410022	-2'1	29'9	6'6	14	47'29	NADPH:secondary-alcohol oxidoreductase-like
	LOC100009551	gi 130491007	-2'1	62'1	6'5	12	15'36	Liver carboxylesterase 1 precursor
642	HBB1	gi 229229	-1'9	16'1	8'2	6	50	Hemoglobina beta
	LOC100357049	gi 291388331	-1'9	14'5	8'8	7	33'00	Heat-responsive protein 12-like
	FABP1	gi 291386371	-1'9	14'1	8	5	38'10	Fatty acid binding protein 1, liver

De los 8 spots identificados, el spot 217 estaba formado por una sola proteína, la catalasa. El resto de spots estaban formados por mezcla de proteínas (Tabla 4).

En el spot 217 se identificó un 45% de la secuencia de la catalasa, CAT (gi |291384816), debido al alineamiento de 27 péptidos. Esta proteína tiene un peso molecular teórico de 59'7 kDa y su pI teórico es de 7'4.

En cada una de las mezclas se seleccionaron las proteínas más representativas en función del porcentaje de secuencia identificada con una confianza del 95% o más (un parámetro que representa la proporción de aminoácidos alineados de péptidos identificados con una confianza igual o mayor al 95% dividido por el número total de aminoácidos), y el número de péptidos alineados. Las proteínas seleccionadas en cada spot se analizaron mediante BLAST2SEQ con el fin de descartar la posibilidad de que exista una alta homología entre ellas y aparezcan como diferencialmente expresadas cuando realmente no lo están. Las 23 proteínas seleccionadas corresponden a 18 distintas, ya que algunas de ellas como la catalasa (CAT), la UDP-glucose-6-dehydrogenase (UGDH) o la aldehído deshidrogenasa 6A1 (ALDH6A1) aparecen en más de un spot.

4.2. ANOTACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

El análisis mediante el software BLAST2GO permitió conocer los términos GO (Gene Ontology) correspondientes a las anotaciones funcionales dentro de las tres categorías (función molecular, proceso biológico en el que participan y componente celular en el que se encuentran) para las 18 proteínas. Tanto la función molecular de las proteínas como los procesos biológicos en los que están involucrados son muy diversos. Las funciones principales que cumplen estas proteínas son la unión de iones y nucleótidos y la actividad oxidoreductasa (Figura 13).

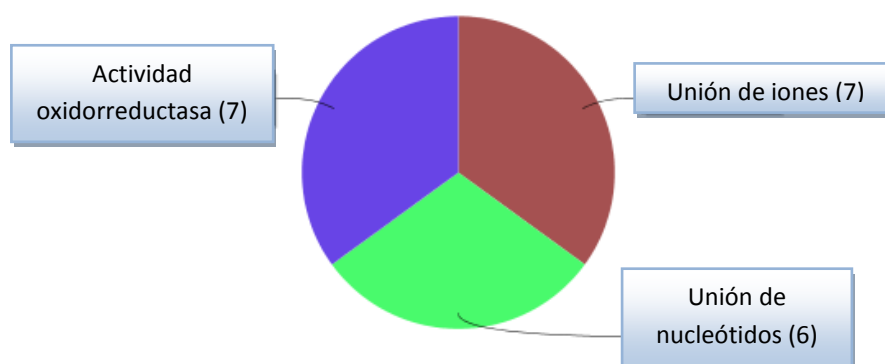


Figura 13. Gráfico que muestra las principales funciones moleculares en las que están involucradas las proteínas detectadas como diferencialmente expresadas, indicando el número de proteínas que interviene en cada función entre paréntesis.

En el caso de los procesos biológicos, las proteínas identificadas participan principalmente en procesos de oxidación-reducción, y en otros procesos como el metabolismo celular, el metabolismo de pequeñas moléculas y lípidos, la regulación de procesos biológicos y la participación en procesos celulares que ocurren en un único organismo (Figura 14). Respecto al componente celular en el que se encuentran, la mayoría de las proteínas se han localizado en orgánulos membranosos como las mitocondrias.

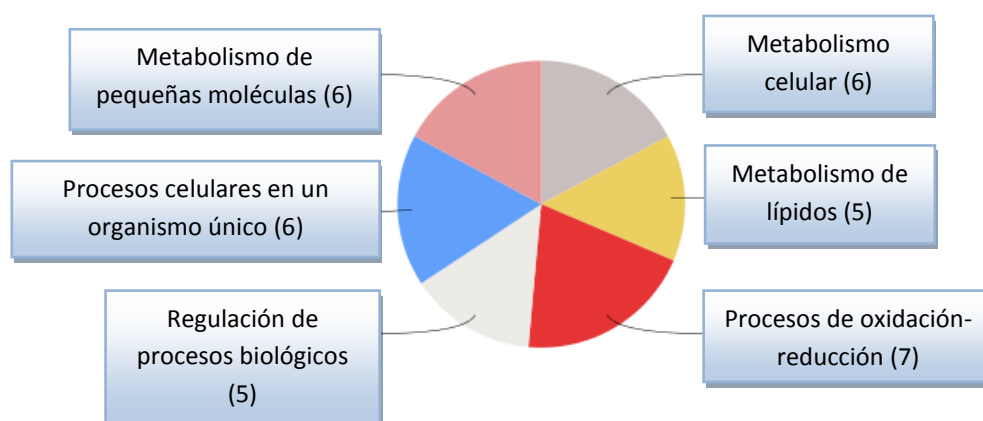


Figura 14. Gráfico que muestra los principales procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas detectadas como diferencialmente expresadas, indicando el número de proteínas que interviene en cada proceso entre paréntesis.

También se realizó un análisis enfrentando las secuencias a la KEGG PATHWAYS Database y se observó que 3 de las proteínas (CPS1, CAT y ALDH1A1) estaban implicadas en la misma ruta, la síntesis de arginina y prolina.

5. DISCUSIÓN

Las condiciones ambientales y el ambiente uterino pueden afectar al desarrollo fetal, pero los embriones han desarrollado mecanismos para adaptarse a estos minimizando las consecuencias negativas que dichas alteraciones pueden desencadenar, pese a que muchas veces implican problemas en el desarrollo fetal y postnatal (Fleming *et al.*, 2004). En este sentido, la hipótesis de la “enfermedad de origen fetal” postula que múltiples respuestas fisiológicas y enfermedades en los individuos adultos son causadas durante el desarrollo embrionario, fetal y postnatal debido a los mecanismos de adaptación (Hochoer, 2014). Nuestros resultados son acordes con esta teoría, ya que el estrés inducido durante la vitrificación implica modificaciones en el hígado del individuo adulto. Estos efectos de reprogramación también se han visto en estudios en los que los embriones fueron expuestos a cafeína, etanol o humo de tabaco (Canales *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

La criobiología es una técnica empleada en reproducción asistida para la conservación de ovocitos y embriones, ya que permite preservar las características físicas y biológicas de las células durante largos períodos de tiempo (Tatone *et al.*, 2010). Pese a la continua optimización de los protocolos de crioconservación, recientemente se ha comprobado que estas técnicas podrían no ser neutrales (Dobrinsky, 1996; Auroux *et al.*, 2004; Tatone *et al.*, 2010; Sáenz-De-Juano *et al.*, 2014).

Pocos trabajos estudian efectos embrionarios sobre los individuos adultos, y hasta la fecha, según nuestro conocimiento, ninguno ha estudiado los efectos de la reprogramación embrionaria sobre el hígado. Cuando los embriones (3 días) son sometidos a la vitrificación, los hígados de los individuos adultos (8 meses) presentan una sobreexpresión de la enzima catalasa. El proceso de enfriamiento y calentamiento aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), productos de las reacciones de oxidación-reducción como consecuencia del estrés oxidativo, lo que se ha observado que altera las funciones y el estado redox celular, comprometiendo el desarrollo embrionario (Bakala *et al.*, 2012). Estas alteraciones producen daños moleculares en el DNA, las proteínas y los lípidos (Brown-Borg y Rakoczy, 2000). Además, induce la expresión de factores apoptóticos mitocondriales (Tatone *et al.*, 2010). Los cambios que se producen en la mitocondria probablemente son derivados de alteraciones de componentes clave en la cadena respiratoria, de manera que se incrementa el ratio de peróxido de hidrógeno mitocondrial (H_2O_2), disminuyendo la actividad respiratoria y sometiendo a la célula a un continuo ciclo de daño oxidativo (Bakala *et al.*, 2012). Uno de los principales mecanismos enzimáticos de las células para eliminar ROS es la eliminación del peróxido de hidrógeno mediante la catalasa, una enzima localizada principalmente en las mitocondrias del hígado y que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (O_2) (Kim *et al.*, 2009). Esta enzima se presenta en forma de tetrámero con cuatro cadenas

polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo procedente de la porfirina que se encuentra en el sitio activo, permitiendo así la reacción con el peróxido de hidrógeno (Qin y Liu, 2013). Debido a su gran tamaño, el centro redox del grupo hemo queda dentro de la estructura macromolecular (Tehrani *et al.*, 2013) (Figura 15). Aunque la producción de peróxido de hidrógeno es importante en el proceso de señalización (mensajero intracelular inocuo), un exceso produce graves daños oxidativos en la mitocondria (Bakala *et al.*, 2012). La sobreexpresión de la catalasa en los hígados de animales procedentes de embriones que fueron vitrificados en un estadio temprano, podría indicar una reprogramación frente al estrés oxidativo.

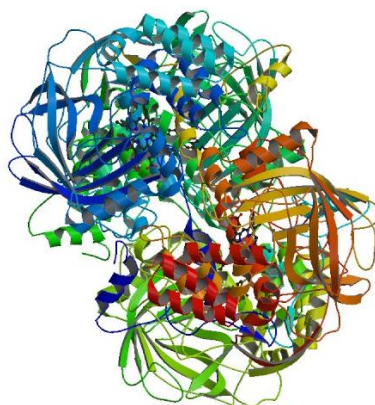


Figura 15. Estructura secundaria de la catalasa (Protein Data Bank, visto el 7 de junio de 2014).

La deficiencia de la catalasa como consecuencia de mutaciones en el gen que la codifica tienen un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades como la diabetes mellitus de tipo 2 (Dai *et al.*, 2014), así como el exceso de ROS que crea dicha deficiencia está implicado en la patogénesis de otras enfermedades como la aterosclerosis, el cáncer o el Alzheimer (Ma *et al.*, 2006).

Además de la detección de la enzima catalasa en el spot 217, se detectaron otros 3 spots con mezcla de proteínas sobreexpresadas en los hígados procedentes de embriones vitrificados. Algunas de las posibles proteínas sobreexpresadas coincidían con proteínas detectadas en otro trabajo de reprogramación embrionaria (Canales *et al.*, 2012), las cuales pertenecían a las familias de las aldehído (ALDH6A1 y ALDH1A1), dihidrolipoamida (DLD) y glutamato deshidrogenasas (GLUD1). Dentro de la regulación del equilibrio celular peptídico y del plegamiento de proteínas se identificaron enzimas como la disulfuro isomerasa A5 (PDIA5) o la leucina aminopeptidasa 3 (LAP3). Según varios autores, la alteración del ambiente preimplantacional puede provocar la acumulación de proteínas mal plegadas que aumentaría el riesgo de que los individuos adultos padeciesen enfermedades como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*,

2014). Por ello la sobreexpresión de las proteínas PDIA5 y LAP3 podría ser una respuesta para regular el equilibrio proteico tras la reprogramación y de esta manera evitar dicha enfermedad. También se identificó una ATP sintetasa relacionada con la producción de energía.

El análisis según los términos GO reflejó que al menos un 30% de las proteínas tienen actividad oxidorreductasa y participan en procesos celulares de oxidorreducción. Respecto al componente celular, la mayoría de las proteínas se localizan en la mitocondria. Además, también se observó que 3 proteínas (CPS1, CAT y ALDH1A1) participan en una misma ruta, la síntesis de arginina y prolina. Todos estos resultados parecen indicar que el estrés oxidativo y los procesos redox a los que se ve sometido el embrión pueden producir una alteración sobre las proteínas del hígado e inducir la síntesis de nuevos aminoácidos.

Por otro lado también se observaron 4 spots subexpresados, los cuales correspondían a 9 posibles proteínas. La carbamoil-fosfato sintetasa I (CPS1) fue también identificada, y con una menor expresión, en el estudio de Canales *et al.* (2012), y está implicada en la detoxificación del amonio. El resto de proteínas identificadas presentan funciones muy variadas: la hemoglobina beta (HBB1) para el transporte de oxígeno; una proteína de choque térmico (LOC100357049) que actúa como chaperona e interviene en la adhesión celular; la serotransferrina (TFR) para el reconocimiento de señales y el transporte de iones metálicos; la galactokinasa 1 (GALK1) encargada de la regulación de la concentración intracelular de galactosa; la hidroxilasa oxidasa (HAO1) implicada en rutas del metabolismo del nitrógeno, α -oxidación de ácidos grasos, catabolismo del glicolato o metabolismo del glioxilato y pequeñas moléculas; el precursor 1 de la carboxilesterasa hepática (LOC100009551) involucrada en la esterificación del etílico a ácido oleico o etiloato; la proteína de unión de ácidos grasos hepática 1 (FABP1) que participa en la unión de largas cadenas de ácidos grasos, ligandos hidrofóbicos y ácidos biliares; o la alcohol oxidorreductasa secundaria (LOC100345202) encargada de la transferencia de electrones.

Teniendo en consideración todos estos resultados la vitrificación podría no ser neutral, ya que se ha demostrado que la plasticidad que otorga a los embriones la capacidad de sobrevivir y desarrollarse en condiciones de estrés puede inducir su reprogramación, implicando alteraciones fisiológicas y metabólicas en los individuos adultos. Resultados descritos por diversos autores indican que la vitrificación podría alterar los patrones epigenéticos de embriones en desarrollo (Wang *et al.*, 2010; Zhao, *et al.*, 2012). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo deben ser confirmados mediante estudios de expresión génica o inmunohistoquímicos.

6. CONCLUSIÓN

La vitrificación de embriones podría inducir diferencias de expresión de diversas proteínas en los hígados adultos procedentes de embriones vitrificados respecto al grupo control, por lo que no debería ser considerada una técnica neutral. Estas alteraciones proteicas podrían ser la consecuencia de la adaptación al estrés inducido por la vitrificación durante el período embrionario, el cual como ya se ha dicho es principalmente oxidativo.

7. REFERENCIAS

- ADAMS, C.E. (1960). Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Reprod. Fertil.*, 1: 36-44.
- ARAV, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81: 96-102.
- AUROUX, M.; CERUTTI, I.; DUCOT, B.; LOEUILLET, A. (2004). Is embryo-cryopreservation really neutral? A new long-term effect of embryo freezing in mice: protection of adults from induced cancer according to strain and sex. *Reproductive Toxicology*, 18: 813-818.
- BAKALA, H.; HAMELIN, M.; MARY, J.; BOROT-LALOI, C.; FRIGUET, B. (2012). Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822: 1527-1534.
- BESSENFELDER, U.; BREM, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, 99: 53-56.
- BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. (2000). Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Experimental Gerontology*, 35: 199-212.
- CANALES, L.; CHEN, H.; KELTY, E.; MUSAH, S.; WEBB, C.; PISANO, M.M.; NEAL, R.E. (2012). Developmental cigarette smoke exposure: liver proteome profile alterations in low birth weight pups. *Toxicology*, 300: 1-11.
- DAI, J.; LIU, M.; AI, Q.; LIN, L.; WU, K.; DENG, X.; JING, Y.; JIA, M.; WAN, J.; ZHANG, L. (2014). Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chemico-Biological Interactions*, 216: 34-42.
- DANIEL, J.C. Jr. (1964). Early growth of rabbit trophoblast. *Am. Nat.*, 98: 85-98.
- DOBRINSKY, J.R. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45: 17-26.
- DURANTHON, V.; BEAUJEAN, N.; BRUNNER, M.; ODENING, K.E.; NAVARRETE SANTOS, A.; KACSKOVICS, I.; HIRIPI, L.; WEINSTEIN, E.J.; BOSZE, Z. (2012). On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Tools*, 21: 699-713.
- ENDERS, A.; BLANKENSHIP, T. (1999). Comparative Placental Structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38: 3-15.
- FAHY, G.M.; MacFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.

- FAHY, G.M. (1986). The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13.
- FAHY, G.M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. (2004). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 48: 22-35.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE SANTOS, A. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144: 1-10.
- FLEMING, T.P.; KWONG, W.Y.; PORTER, R.; URSELL, E.; FESENKO, I.; WILKINGS, A.; MILLER, D.J.; WATKINS, A.J.; ECKERT, J.J. (2004). The embryo and its future. *Biol. Reprod.*, 71: 1046-1054.
- GOLDSTEIN, J.M.; HANDA, R.J.; TOBET, S.A. (2014). Disruption of fetal hormonal programming (prenatal stress) implicates shared risk for sex differences in depression and cardiovascular disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35: 140-158.
- GYGI, S.P.; RIST, B.; AEBSOLD, R. (2000). Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 396-401.
- HARPER, M.J. (1961). The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, 22: 147-152.
- HOCHER, B. (2014). More than genes: the advanced fetal programming hypothesis. *J. Reprod. Immunol.*, DOI: 10.1016/j.jri.2014.03.001
- HOHN, H.P.; MOOTZ, U.; DENKER, H.W. (1992). Development of rabbit preimplantation blastocysts cultured with precultured endometrial tissue. *J. Reprod. Fert.*, 95: 409-420.
- IZZOTTI, A.; BALANSKY, R.M.; CARTIGLIA, C.; CAMOIRANO, A.; LONGOBARDI, M.; DE FLORA, S. (2003). Genomic and transcriptional alterations in mouse fetus liver after transplacental exposure to cigarette smoke. *The FASEB Journal*, 17: 1127-1129.
- KIM, S.J.; LEE, J.W.; JUNG, Y.S.; KWON, D.Y.; PARK, H.K.; RYU, C.S.; KIM, S.K.; OH, G.T.; KIM, Y.C. (2009). Ethanol-induced liver injury and changes in sulfur amino acid metabolomics in glutathione peroxidase and catalase double knockout mice. *Journal of Hepatology*, 50: 1184-1191.
- LABORDE, C.M.; ZUBIRI, I.; ALONSO-ORGAS, S.; MOURINO-ÁLVAREZ, L.; ÁLVAREZ-LLAMAS, G.; BARDERAS, M.G. (2011). Aportaciones de la proteómica al laboratorio clínico. *Revista de Laboratorio Clínico*, 4: 214-224.

- LARSEN, J.F. (1962). Electron microscopy of the chorioallantoic placenta of the rabbit: I. The placental labyrinth and the multinucleated giant cells of the intermediate zone. *Journal of Ultrastructure Research*, 7: 535-549.
- LAVARA, R.; BASELGA, M.; VICENTE, J.S. (2011). Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology*, 76: 652-657.
- LAVARA, R.; BASELGA, M.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE, J.S. (2014). Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. *Theriogenology*, 81: 988-992.
- LÉANDRI, R.D.; ARCHILLA, C.; BUI, L.C.; PEYNOT, N.; LIU, Z.; CABAU, C.; CHASTELLIER, A.; RENARD, J.P.; DURANTHON, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiological genomics*, 36: 98-113.
- LEIBO, S.; SONGSASES, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326.
- LEIBO, S. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69: 37-47.
- LEIBO, S. (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reprod. Biomed. Online.*, 25: 146-167.
- LI, Y.; WANG, H. (2004). In utero exposure to tobacco and alcohol modifies neurobehavioral development in mice offspring: consideration a role of oxidative stress. *Pharmacological Research*, 49: 467-473.
- LIU, J.; PHY, J.; YEOMANS, E. (2012). Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology*, 78: 1641-1652.
- LIU, X.J.; JIA, G.H.; ZHANG, G.; TIAN, K.Y.; WANG, H.X.; ZHONG, W.Y.; ZHANG, Y.M.; LU, X.L.; LI, J.T.; ZHANG, J.M. (2013). Effect of vitrification of mouse oocyte on the behavior of adult offspring. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 169: 279-282.
- LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; BOLAND, E.; RIZOS, D.; FAIR, T.; DUFFY, P.; SUNG, L.Y.; DU, F.; CHAUBAL, S.; XU, J.; YANG, X.; TIAN, X.C. (2007). Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified *in vivo* and cloned bovine embryos. *Theriogenology*, 68: 1128-1137.

- LUO, H.; DENG, Z.; LIU, L.; SHEN, L.; KOU, H.; HE, Z.; PING, J.; XU, D.; MA, L.; CHEN, L.; WANG, H. (2014). Prenatal caffeine ingestion induces transgenerational neuroendocrine metabolic programming alteration in second generation rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274: 383-392.
- MA, S.F.; NISHIKAWA, M.; KATSUMI, H.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. (2006). Liver targeting of catalase by cationization for prevention of acute liver failure in mice. *Journal of Controlled Release*, 110: 273-282.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; LAVARA, R.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VICENTE, J.S. (2013). *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*, 79: 1124-1129.
- McARDLE, A.M.; DENTON, K.M.; MADUWEGEDERA, D.; MORITZ, K.; FLOWER, R.L.; ROBERTS, C.T. (2009). Ontogeny of Placental Structural Development and Expression of the Renin-Angiotensin System and 11 β -HSD₂ Genes in the Rabbit. *Placenta*, 30: 590-598.
- MOCÉ, M.L.; BLASCO, A.; SANTACREU, M.A. (2010). *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: Effects on prenatal survival and placental development. *Theriogenology*, 73: 704-710.
- MORGAN, P.M.; KANE, M.T. (1993). Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 97: 101-106.
- PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTTRELL, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551-3567.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666.
- PROTEIN DATA BANK (PDB) 1971, *Crystal Structure of Human Erythrocyte Catalase*, DOI: 10.2210/pdb1qqw/pdb, visto el 7 de junio de 2014, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1QQW>.
- QIN, P.; LIU, R. (2013). Oxidative stress response of two fluoroquinolones with catalase and erythrocytes: A combined molecular and cellular study. *Journal of Hazardous Materials*, 252-253: 321-329.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, 74: 1829-1841.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.

RAMÍREZ-VÉLEZ, R. (2012). *In utero* fetal programming and its impact on health in adulthood. *Endocrinol. Nutr.*, 59: 383-393.

SÁENZ-DE-JUANO, M.D. (2010). *Expresión génica en blastocistos preimplantacionales de conejo*. Trabajo Final de Carrera. Universitat Politècnica de València. 73 pp.

SÁENZ-DE-JUANO, M.D. (Febrero, 2014). *Study of the effect of cryopreservation on rabbit embryo gene expression*. Tesis Doctoral en Ciencia Animal. Universitat Politècnica de València. 176 pp.

SÁENZ-DE-JUANO, M.D.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; SCHMALTZ-PANNEAU, B.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D.S.; JOUNEAU, L.; LECARDONNEL, J.; LAVARA, R.; NATURIL-ALFONSO, C.; DURANTHON, V.; VICENTE, J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147: 789-801.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. (2009). Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 71: 1425-1432.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141: 1-19.

SHEN, L.; LIU, Z.; GONG, J.; ZHANG, L.; WANG, L.; MAGDALOU, J.; CHEN, L.; WANG, H. (2014). Prenatal ethanol exposure programs an increased susceptibility of non-alcoholic fatty liver disease in female adult offspring rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274: 263-273.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSE, P.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Spotademy of Sciences of the United States of America*, 93: 14440-14445.

SHIOMI, M.; ITO, T. (2009). The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: A tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis*, 207: 1-7.

STROUD, L.R.; PAPANDONATOS, G.D.; RODRÍGUEZ, D.; McCALLUM, M.; SALISBURY, A.L.; PHIPPS, M.G.; LESTER, B.; HUESTIS, M.A.; NIAURA, R.; PADBURY, J.F.; MARSIT, C.J. (2014). Maternal smoking during pregnancy and infant stress response: Test of a prenatal programming hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, DOI: 10.1016/j.psyneuen.2014.05.017

- SULTANA F.; HATORI, M.; SHIMOZAWA, N.; EBISAWA, T.; SANKAI, T. (2009). Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48: 52-56.
- TAO, T.; NIEMANN, H. (2000). Cellular Characterization of Blastocysts Derived from Rabbit 4-, 8- and 16-Cell Embryos and Isolated Blastomeres Cultured *in Vitro*. *Human Reproduction*, 15: 881-889.
- TATONE, C.; DI EMIDIO, G.; VENTO, M.; CIRIMINNA, R.; ARTINI, P.G. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology*, 26: 563-567.
- TEHRANI, H.S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; CHOURCHIAN, H. (2013). Correlation Between biological activity and electron transferring of bovine liver catalase: Osmolytes effects. *Electrochimica Acta*, 113: 591-602.
- VANDERZWALMEN, P. (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reprod. Biomed. Online*, 25: 146-167.
- VATJA, G.; KUWAYAMA, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65: 236-244.
- VICENTE, J.; VIUDES DE CASTRO, M.P.; GARCÍA, M.L. (1999). *In vivo* survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reprod. Nutr. Dev.*, 39: 657-662.
- VICENTE, J.S.; SÁENZ-DE-JUANO, M.D.; JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; VIUDES-DECASTRO, M.P.; PEÑARANDA, D.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2013). Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology*, 67: 321-326.
- VIEBAHN, C. (2001). Hensen's node. *Genesis*, 29: 96-103.
- WANG, L.; SHEN, L.; PING, J.; ZHANG, L.; LIU, Z.; WU, Y.; LIU, Y.; HUANG, H.; CHEN, L.; WANG, H. (2014). Intrauterine metabolic programming alteration increased susceptibility to non-alcoholic adult fatty liver disease in prenatal caffeine-exposed rat offspring. *Toxicology Letters*, 224: 311-318.
- WANG, Z.; XU, L.; HE, F. (2010). Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertility and sterility*, 93: 2729-2733.
- WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science*, 178: 411-414.

WILMUT, I. (1972). Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during cooling and thawing. *Life Sci.*, 11: 1071-1079.

ZDRAVKOVIC, T.; GENBACEV, O.; McMASTER, M.T.; FISHER, S.J. (2005). The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta*, 26: S81-S86.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J.; ARAV, A. (2002). The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Criobiology*, 45: 143-152.

ZHAO, X.M.; DU, W.H.; HAO, H.S.; WANG, D.; QIN, T.; LIU, Y.; ZHU, H.B. (2012). Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 79: 445-450.